



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO**

AMANDA JHESSY MARQUES COSTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DILUENTES E
MÉTODOS DE PLAQUEAMENTO NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE
UMA CULTURA PROBIÓTICA**

**BRASÍLIA – DF
2018**



AMANDA JHESSY MARQUES COSTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DILUENTES E
MÉTODOS DE PLAQUEAMENTO NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE
UMA CULTURA PROBIÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Nutrição da
Faculdade de Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do
título de Bacharel em nutrição.

Orientadora: Prof.^a Dra. Eliana Santos
Leandro

BRASÍLIA – DF
2018

AMANDA JHESSY MARQUES COSTA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DE DIFERENTES SOLUÇÕES DILUENTES E
MÉTODOS DE PLAQUEAMENTO NA DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DE
UMA CULTURA PROBIÓTICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Nutrição da UnB
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharel em Nutrição.

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Eliana Santos Leandro
(Orientadora)

Prof. Dr. Ernandes Rodrigues de Alencar

MSc. Lígia Isoni Auad

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me proporcionado a oportunidade de chegar até aqui e por sua proteção ao longo dessa jornada.

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todos os meus sonhos e realizações. Sou grata a eles por todo o tempo que estiveram ao meu lado, me conduzindo e auxiliando durante minhas escolhas, festejando minhas vitórias e contribuindo em minha formação acadêmica.

À minha irmã Fernanda, por seu amor, brincadeiras, descontrações e momentos de alegria.

Aos meus familiares, pela compreensão e suporte durante o curso.

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Eliana dos Santos Leandro, por todos os ensinamentos, dedicação e amparo na elaboração deste trabalho.

Aos estagiários e técnicos do laboratório, por todo auxílio durante as análises.

Aos professores Márcio e Ernandes, por terem me proporcionado aulas incríveis, que proporcionam alegria e descontração durante o processo de aprendizagem.

Aos meus colegas de curso, mais especificamente aos grupos “Quase nutricionistas” e “NSP da ralé”, por terem oferecido momentos memoráveis.

RESUMO

O aumento da busca por uma alimentação saudável atraiu o interesse da indústria alimentícia. Desse modo, houve a formação de novos produtos como os probióticos. Probióticos são micro-organismos vivos capazes de oferecer algum benefício para saúde do hospedeiro, no entanto, o processamento pode comprometer as características das células. A ANVISA estabelece requisitos para manter um padrão de qualidade na comercialização desse produto e, dessa forma, faz-se necessária a elaboração de estudos e pesquisas que investiguem a qualidade dos produtos disponíveis no mercado para verificar se as empresas seguem esses requisitos. O experimento consistiu na reidratação de uma cultura probiótica liofilizadas em quatro tipos de diluentes: solução salina, Ringer, água peptonada e MRS. Cada amostra foi homogeneizada e, após o tempo de reidratação, foram feitas diluições seriadas. Logo após, foram plaqueadas pelos métodos *Pour plate* e *Spread plate*. Fez-se também a microdiluição das amostras reconstituídas. As placas de Petri e de microdiluição foram incubadas por um tempo total de 48 horas. Nos métodos *Pour plate* e *Spread plate*, verificou-se o crescimento celular correspondente a $<2\text{Log UFC/g}$ e, na microdiluição, apurou-se a presença de turbidez fraca na reidratação em MRS e ausência de turbidez para os demais diluentes. Portanto, constatou-se que o produto em questão não estava de acordo com os padrões de qualidade para ser considerado probiótico e propagar alegações de benefícios, uma vez que as células estavam injuriadas e inviáveis.

Palavras-chave: Probiótico. Liofilização. Viabilidade. *Lactobacillus acidophilus*.

ABSTRACT

Growth in demand for healthy food caught the attention of the food industry. Then, emerged new products like the probiotics. Probiotics are alive microorganisms capable to offer some healthy benefit for the host. Although, the processing can compromise the cells characteristics. ANVISA establishes requirements to keep a quality padron in the commercialization of this product, and in this way becomes necessary the elaboration of studies and research to investigate the quality of the products available in the market, verifying if the enterprises follows that requirements. The experiment consisted in the rehydration of an probiotic culture freeze-dried in four types of diluents: saline solution, ringer, peptone water and MRS. Each sample was homogenized and after the time of rehydration some sequential dilutions were made; Soon after, were put on plates by the methods pour plate and spread plate. Also, was made a microdilution of the reconstituted samples. The Petri Plates and the microdilution plates were incubated by a total time of forty-eight hours (48h). In the pour plate and spread plate methods, verified the cellular growth corresponding to $<2\text{Log UFC/g}$ and in the microdilution was noticed weak turbidity for the MRS rehydration and absence of turbidity for the others diluents. Thus, verified that the product under analysis was not according with the quality requirements to be considered a probiotic and fulfill benefits allegations, since the cells were injured and infeasible.

Keywords: Probiotic. Freeze-dried. Viability. *Lactobacillus acidophilus*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – População estimada de acordo com método de plaqueamento, tempo de reidratação, tipo de diluente e grau de diluição19

Tabela 2 – Grau de turbidez em decorrência do diluente e tempo de incubação por meio de microdiluição.....21

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo geral	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REFERENCIAL TEÓRICO	11
3.1	Microrganismos probióticos e bactérias lácticas	11
4	METODOLOGIA	16
4.1	Obtenção do produto probiótico	16
4.2	Reidratação do produto probiótico liofilizado	16
4.3	Determinação da viabilidade	16
4.3.1	<i>Pour Plate</i>	17
4.3.2	<i>Spread Plate</i>	17
4.3.3	<i>Microdiluição</i>	17
4.4	Análise dos resultados	18
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

De acordo com uma recente pesquisa realizada pela Federação das Indústrias do Estado de São Paulo (FIESP, 2018), verificou-se que os hábitos alimentares dos brasileiros estão passando por transformações, onde há preocupação com a saúde e entendimento acerca de fatores que estão relacionados com a prevenção de doenças e melhorias na sua própria saúde. Nesse cenário de adoção de novos hábitos, destaca-se a procura por uma alimentação equilibrada e estilo de vida saudável.

Com essa crescente notoriedade do valor da alimentação equilibrada, houve atração da indústria alimentícia para atender esse público consumidor de alimentos saudáveis. Deste modo, pesquisas e inovações tecnológicas na produção de alimentos foram fomentadas, de forma que evidencia a demanda pela preservação da biodisponibilidade das propriedades funcionais dos alimentos e a formulação de alimentos que portam a característica de proporcionar benefícios à saúde (BAJPAI et al., 2018; SANSONE et al., 2018).

Dentre os produtos elaborados com o intuito de oferecer qualidades vantajosas para a saúde, encontra-se a categoria que vincula características probióticas. Os probióticos são descritos como micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, são capazes de oferecer algum benefício para a saúde do hospedeiro (FAO; WHO, 2001). O uso de probióticos disseminou-se para a intervenção em desarranjos intestinais e no interesse em estabelecer a saúde da microbiota que, por sua vez, é capaz de interferir convenientemente na saúde humana no contexto de doenças gastrointestinais e hepáticas (DAILEY et al., 2018).

Os probióticos podem ser utilizados pela indústria na fabricação de bebidas e alimentos fermentados com finalidade de obtenção de características sensoriais como também com fins terapêuticos. Dentre os alimentos adicionados de culturas probióticas, destacam-se os alimentos lácteos como queijos, iogurtes, leite fermentado e formulações infantis, sendo o leite fermentado compondo-se de *Lactobacillus casei* o primeiro produto probiótico comercializado (RAUTAVA, WALKER, 2009; SACCARO, 2008; SAAD, 2006).

Tratando especificamente do uso terapêutico, as culturas probióticas podem ser comercializadas em sua forma liofilizada que produz células viáveis para posterior encapsulação. O processo de liofilização submete as células a variações extremas de temperatura e tais variações podem ocasionar a perda de viabilidade das células. No entanto, são utilizadas técnicas que objetivam manter as células viáveis mesmo após passar pelo processo de liofilização. Uma dessas técnicas é a utilização de substâncias crioprotetoras que permitem assegurar a qualidade da cápsula probiótica a ser comercializada em seu processo de obtenção (LI et al., 2016; HER; KIM; LEE, 2014; GBASSI; VANDAMME, 2012; JALALI et al., 2012).

Com isso, existem legislações incumbidas de certificar a comercialização dos produtos probióticos disponibilizados pela indústria e regulamentar as alegações de benefícios a saúde que esses produtos referem. Tanto na Europa, quanto nos Estados Unidos, existem legislações que solicitam a comprovação das alegações de benefícios por meio de evidências científicas (GONZÁLEZ-DÍAZ; GIL-GONZÁLEZ; ÁLVAREZ-DARDET, 2018).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) dispõe na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 241, de 26 de Julho de 2018, que os fabricantes de produtos probióticos devem apresentar documentos técnicos devidos que comprovem a viabilidade da cultura, bem como os benefícios alegados de acordo com a estirpe utilizada, que também deve ser exposta e caracterizada. Dessa forma, faz-se necessária a elaboração de estudos e pesquisas que investiguem a qualidade dos produtos disponíveis no mercado e suas adequações quanto aos requisitos propostos pela legislação, da mesma maneira que é importante averiguar diferentes métodos utilizados na condução do estudo de viabilidade das células.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de diferentes soluções diluentes e métodos de plaqueamento na determinação da viabilidade de um produto probiótico liofilizado.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar diferenças entre a reconstituição do probiótico em diferentes diluentes;
- Verificar efeitos na variação do tempo de reidratação e do meio de reidratação do produto probiótico;
- Verificar a viabilidade das células através dos métodos de plaqueamento *Pour plate* e *Spread plate* e pela técnica microdiluição.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Microrganismos probióticos e bactérias lácticas

A palavra probiótico tem sua origem grega, onde o prefixo “pro” assume o sentido de vantagem e “bio” significa vida. Assim, o termo probiótico significa “a favor da vida” ou “para vida”. Os probióticos foram inicialmente descritos por Metchnikoff e Mitchell (1908) ao teorizar que poderiam surtir efeitos benéficos a saúde a partir de alterações na microbiota intestinal com bactérias benéficas encontradas em produto lácteo fermentado (MACKOWIAK, 2013; QUIGLEY, 2010). Já o termo probiótico foi definido inicialmente por Lilly e Stillwell (1965) como substâncias secretadas por organismos, que assim podem estimular o crescimento de novos microrganismos. Posteriormente, em 1974, Parker (1974) definiu que probióticos são organismos e as substâncias por eles secretadas, de forma que contribuem com o equilíbrio da microbiota intestinal.

De acordo com a FAO; WHO (2001), probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro”. Já a ANVISA, conforme a instrução normativa RDC nº 2 de 2002 (BRASIL, 2002), define que probióticos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio”, no entanto, essa não possui caráter legislativo. Para serem considerados probióticos, os microrganismos devem ter origem humana, bem como resistir às condições de processamento e gastrointestinais, não devem apresentar patogenicidade e devem conferir efeitos benéficos à saúde humana, conforme o estabelecido pela *Food and Agriculture Organization of the United Nations e World Health Organization* (FAO; WHO, 2001).

Dentre esses microrganismos capazes de conferir esses efeitos positivos encontram-se as Bactérias ácido-lácticas, mais especificamente o gênero *Lactobacillus* (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. crispatus*, *L. johnsonii*, *L. murinus*, *L. intestinalis*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. salivarius*), que é o mais utilizado como probiótico e o gênero *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium bifidum*, *B. infantis*, *B. Longum*, *B. Brevis* e *B. lactis*) (GUARNER

et al., 2011). O gênero *Bifidobacterium* já foi considerado como bactéria lática por compartilhar algumas de suas características em comum, no entanto, é filogeneticamente independente. (WESSELS et al., 2004).

As bactérias ácido lácticas (BAL) são Gram-positivas, anaeróbias, catalase negativas e não formadoras de esporos, morfologicamente podem ser formadoras de cocos ou bastões. Quanto à temperatura de crescimento, as bactérias ácido lácticas são classificadas como mesófilas, isto é, apresentam crescimento ótimo em temperaturas entre 25°C e 45°C (FORSYTHE, 2013). Considerando o produto final da fermentação, são agrupadas em homofermentativas e heterofermentativas, sendo que as homofermentativas produzem principalmente ácido láctico a partir da fermentação de glucose e as heterofermentativas produzem outras substâncias além de ácido láctico, como dióxido de carbono, ácido acético e etanol (CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

As bactérias ácido láctica fazem parte da microbiota humana e são encontradas tanto nas mucosas humanas como também podem ser adquiridas através da alimentação, em razão de participarem do processo de produção de alimentos com carnes, vinhos, laticínios e vegetais acidificados (FORSYTHE, 2013). O amplo uso dos probióticos na indústria de alimentos se estende desde métodos convencionais, como a produção de queijos, e segue até desenvolvimentos mais recentes da tecnologia de alimentos (RIBEIRO; SIMÕES; JURKIEWICZ, 2009).

Além disso, as bactérias ácido lácticas são utilizadas na silagem para alimentação animal a fim de conferir os benefícios e aumentar a qualidade da carne do animal alimentado com probióticos (KUSS et al., 2009). A BAL também pode ser adicionada com agente de biopreservação em frutas e vegetais a partir do controle de fungos e bactérias (SOBRINO-LÓPEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2008). Portanto, destaca-se também que estas bactérias podem conferir aumento da vida de prateleira, valor nutricional, sabor, aroma e textura de um produto (RODRIGUES; FELKL; BITENCOURT, 2012; OLIVEIRA et al., 2002).

As bactérias ácido lácticas possuem a capacidade de conservação, isto é, contribuem positivamente com a vida útil de prateleira do alimento a qual elas

foram adicionadas (RODRIGUES; FELKL; BITENCOURT, 2012). O que pode ser explicado pela característica de biocontrole que essas bactérias possuem, ou seja, as bactérias probióticas possuem ação antimicrobiana a partir da liberação de bacteriocinas que possuem ação contra microrganismos patogênicos, liberam também ácidos orgânicos que conferem vantagens às bactérias lácticas no processo de fixação na mucosa intestinal e a competição por nutrientes é outro fator que explica a ação antimicrobiana (DALIÉ et al., 2009; FLEMMING; FREITAS, 2005; FULLER et al., 1989; PETRI, 2000).

As bactérias probióticas são utilizadas pela indústria principalmente em alimentos infantis, produtos lácteos e preparações farmacêuticas, sendo o grupo dos lácteos o mais representativo deles (SACCARO, 2008). Portanto, a produção de alimentos probióticos e a realização de pesquisas com culturas probióticas está voltada para a utilização alimentos de origem animal, como leites fermentados e iogurtes, por serem os mais comercializados nesse contexto (SAAD, 2006).

Além da apresentação em alimentos, as culturas probióticas são comercializadas também em forma de comprimidos, cápsulas e sachês compostos pela bactéria liofilizada (GUARNER et al., 2011). A liofilização é um dos métodos utilizados para obtenção de células viáveis para encapsulação. Esse método consiste na secagem a partir do congelamento e sublimação do líquido presente. O processo é compreendido por três etapas: congelamento rápido, desidratação primária e desidratação secundária, sendo as etapas de desidratação e as condições de armazenamento responsáveis por perdas na sobrevivência das células (SANTIVARANGKNA et al., 2011).

Dentre outros fatores que interferem na sobrevivência das células encontram-se o meio de congelamento, temperatura, atmosfera, temperatura de desidratação e atividade de água (CHAMPAGNE et al., 1991). Portanto, para garantir a viabilidade da cultura probiótica, existem fatores que visam a proteção para submeter ao processo de encapsulação. Uma das formas de auxiliar na proteção é a utilização do meio de liofilização composto por carboidratos, que tem seus mecanismos atribuídos às ligações de hidrogênio entre a membrana da célula e o meio de cultura, e a partir disso são desencadeadas as ações de

proteção (LESLIE et al., 1995; CARVALHO et al., 2004). Além disso, o uso de carboidratos como meio de liofilização permite, durante o processo de desidratação, a formação de uma matriz vítrea que previne reações e processos inativadores das células (SANTIVARANGKNA, et al., 2011). No entanto, esse estado vítreo não é capaz de impedir sozinho todos os fatores que causam danos às células (KURTMANN et al., 2009)

Ademais, existem outras maneiras de promover a proteção celular para evitar o dano durante a liofilização. Dentre eles encontram-se um eficiente processo de encapsulação, utilização de substâncias crioprotetoras, como substâncias prebióticas, açúcares e leite desnatado, e a aplicação de tratamentos de estresse subletais, como choque térmico (LI, et al. 2016; IRAVANI; KORBOKANDI; MIRMOHAMMADI, 2015; SAVINI et al. 2010). Tratando-se da utilização de substâncias crioprotetoras e exposição a estresses subletais, foi verificado que essas duas formas de tratamento são apropriadas para proteger as células durante o processo de liofilização e armazenamento (LEANDRO et al. 2013).

Já para o encapsulamento ser eficaz para preservar a cultura probiótica diante das adversidades de armazenamento, depende do material utilizado em sua produção. Dentre os materiais estudados encontram-se alginato, quitosana, carragenina, gomas, gelatina, proteína de soro de leite, amido e revestimento por compressão. O material utilizado deve ser capaz de manter a viabilidade do probiótico perante as condições gastrointestinais, resistir ao meio ambiente e circunstâncias de armazenamento e processamento. Dos materiais estudados, nem todos preenchem totalmente os requisitos mencionados, como por exemplo o alginato que, apesar de resistir ao trato gastrointestinal, não protege contra o meio ambiente (HADZIEVA et al., 2017; LI et al., 2016; IRAVANI; KORBOKANDI; MIRMOHAMMADI, 2015).

Portanto, para assegurar que as células estejam viáveis e possam ser comercializadas, deve-se assegurar que o conteúdo do produto esteja de acordo com o aprovado para rotulagem. E com isso a ANVISA é responsável por estabelecer normas, conceder registros de produtos, segundo as normas de sua área de atuação, controlar e fiscalizar, com o intuito de garantir a qualidade das

culturas probióticas comercializados (BRASIL, 1999a; BRASIL, 2000; STRINGHETA et al., 2007).

A quantidade mínima de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* para conferir benefício à saúde deve estar entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e o produto comercializado deve apresentar essa quantidade mínima de colônias, e a empresa deve comprovar sua eficácia a partir da apresentação de laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade e teste de resistência da cultura utilizada à acidez gástrica e aos sais biliares (BRENNAN; WANISMAIL; BIBEK, 1983; ANVISA, 2018).

4. METODOLOGIA

Trata-se de um estudo experimental de caráter qualitativo e quantitativo realizado no Laboratório de Higiene dos Alimentos do Departamento de Nutrição da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, Brasília – DF.

4.1. Obtenção do produto probiótico

Adquiriu-se um produto probiótico encapsulado em uma farmácia do Distrito Federal para avaliar se a viabilidade do micro-organismo probiótico correspondia a informada pelo fabricante. Na embalagem do produto probiótico, consta que o produto contém $2,0 \times 10^8$ UFC/g do probiótico por cápsula. Na bula do produto consta que juntamente com o probiótico há presença de estabilizantes, antiuementantes e corantes. Na embalagem, consta a informação que o produto foi fabricado em janeiro de 2018 e a data de vencimento é referente a janeiro de 2020.

4.2 Reidratação do produto probiótico liofilizado

A reidratação do produto probiótico liofilizado foi realizada nos seguintes meios: (i) água peptonada 0,1%; (ii) salina 0,85 %; (iii) solução *Ringer solution* e (iv) caldo MRS. O produto probiótico liofilizado foi retirado das cápsulas e colocados em microtubos *ependorffs* de capacidade de 1,5 mL. Alíquotas de 1 mL das soluções diluentes foram adicionadas nos *ependorffes* contendo o probiótico. O produto foi homogeneizado e incubado a 37 °C por 1h e 2 horas.

4.3 Determinação da viabilidade

Após o período de reidratação os produtos reidratados foram avaliados pelos seguintes métodos microbiológicos: (i) plaqueamento em MRS pela

técnica *Pour plate*; (ii) plaqueamento em MRS pela técnica *Spread plate* e (iii) pela técnica de microdiluição em caldo MRS.

4.3.1. *Pour Plate*

Alíquota de 1 mL de cada amostra reconstituída por 1h ou 2h foram submetidas a diluições seriadas em água peptonada 0,1 %. As diluições de 10^{-1} a 10^{-8} foram selecionadas para serem plaqueadas. Em placas vazias, alíquotas de 1 mL das diluições foram adicionadas na placa de Petri vazia e, em seguida, adicionou-se aproximadamente 20 mL do meio MRS agar. A amostra e o MRS agar foram homogeneizados por movimentos circulares em formato de oito. Esperou-se o endurecimento do meio e o mesmo foi incubado a 37 °C em estufa bacteriológica por 48h.

4.3.2. *Spread Plate*

Alíquota de 1 mL de cada amostra reconstituída por 1h ou 2h foram submetidas a diluições seriadas em água peptonada 0,1 %. As diluições de 10^{-1} a 10^{-8} foram selecionadas para serem plaqueadas. Em placas contendo MRS agar, adicionou-se 0,1 mL das diluições e espalhadas com alça de *drigalsky* até obter a secagem da placa. As placas foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 48h.

4.3.3. *Microdiluição*

Nesta técnica, utilizou-se placa de microdiluição de 96 poços preenchidas com 90 µL de caldo MRS. Produto probiótico reidratado nos diferentes diluentes foi submetido a diluição seriada nos pocinhos contendo caldo MRS. A placa foi incubada a 37 °C em estufa bacteriológica e foram avaliadas quanto ao crescimento com 24h e 48h de incubação.

4.4. Análise dos resultados

Os resultados obtidos pelas técnicas de plaqueamento por *Spread plate* e *Pour plate* levam em consideração o número de Unidades Formadoras de Colônias obtidas. Recomenda-se a contagem das placas que apresentam entre 25 a 250 colônias. Já pelo método de microdiluição, avalia-se somente a presença de turbidez do meio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 1 a seguir, estão apresentados os resultados obtidos com os métodos de plaqueamento *Spread plate* e *Pour plate*.

Tabela 1 – População estimada de acordo com método de plaqueamento, tempo de reidratação, tipo de diluente e grau de diluição

Método	Diluente	Tempo de reidratação	População estimada
<i>Spread plate</i>	Água peptonada	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g
	Solução Ringer	1h	<2 Log UFC/g
		2h	<2 Log UFC/g
	Caldo MRS	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g
	Solução salina 0,85%	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g
	Água peptonada	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g
<i>Pour Plate</i>	Solução Ringer	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g
	Caldo MRS	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g
	Solução salina 0,85%	1h	<2Log UFC/g
		2h	<2Log UFC/g

Fonte: A autora.

Os métodos *Pour plate* e *Spread plate* apresentaram resultados estimados correspondentes a <2 UFC/g para todos os diluentes utilizados e tempos de reidratação. As variações extremas de temperatura durante a liofilização e processo de armazenamento são capazes de comprometer a

fluidez da membrana celular e, a partir disso, prejudicar as funções e atividades dessas células (MILLS et al., 2011).

No entanto, para evitar esses danos, são utilizados agentes crioprotetores que são capazes de reduzir o estresse físico e químico advindos dessas variações de temperatura (AGUIAR et al., 2012). Neste caso, presume-se que a substância crioprotetora utilizada não foi eficaz na proteção dos danos causados pela liofilização da cultura analisada, uma vez que a viabilidade da célula pode variar de acordo com o tipo de substância utilizada e conforme a concentração deste crioprotetor (SULTANA et al., 2000).

Outro fator ao qual foi atribuído o resultado obtido da cultura em questão foi o tipo de estirpe utilizada. Ainda que a estirpe utilizada não tenha sido informada, sabe-se que o grau de viabilidade da cultura também varia de acordo com a estirpe empregada no processo (MORGAN et al., 2006). E mesmo estando dentro do prazo de validade, pode ter ocorrido perda da viabilidade. Por consequência disso, a cultura analisada encontra-se fora das características para ser considerada probiótica, uma vez que a quantidade mínima de células viáveis deve estar entre 10^8 e 10^9 Unidades Formadoras de Colônias. Sendo essa a quantidade de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* liofilizadas que contribui de forma eficaz para a saúde humana e para ser considerado como probiótico. Uma das condições para uma estirpe ser considerada probiótica é apresentar sobrevivência a diferentes processos tecnológicos e manter uma quantidade mínima de células viáveis (10^6 UFC mL⁻¹) para proporcionar os benefícios a saúde do consumidor (BRENNAN; WANISMAIL; BIBEK, 1983).

Portanto, para garantir a segurança e certificar que a cultura probiótica comercializada ofereça os benefícios para a saúde humana, foi estabelecido pela ANVISA (2018) que as empresas que manipulam esse produto devem emitir os documentos técnicos que identifiquem corretamente a espécie e linhagem utilizada e que caracterizem também a linhagem. Além disso, as empresas da mesma forma têm de apresentar evidências e testes que comprovem o benefício à saúde e sobrevivência em condições gástricas, considerando a quantidade mínima de células viáveis para obtenção desses efeitos benéficos.

Na tabela 2 a seguir, estão apresentados os resultados referentes ao método de microdiluição

Tabela 2 – Grau de turbidez em decorrência do diluente e tempo de incubação por meio de microdiluição

Método	Diluente	Tempo de Incubação	Grau de turbidez
Microdiluição	Água peptonada	24h	-
		48h	-
	Solução <i>Ringer</i>	24h	-
		48h	-
	Caldo MRS	24h	-
		48h	Presença de turbidez fraca
	Solução salina 0,85%	24h	-
		48h	-

Fonte: A autora.

Ao empregar a técnica de microdiluição, verificou-se que nas primeiras 24h não houve alteração na turbidez em nenhum dos poços, mas ao completar 48h constatou-se a viabilidade de culturas nas diluições feitas em caldo MRS. Assim como ocorreu nos diferentes plaqueamentos, verificou-se que houve dano à célula, sendo essa parcialmente recuperada em meio diluente MRS por um tempo de 48h. Esta condição de enriquecimento proporcional à recuperação das células ocorreu provavelmente pelo fato do caldo MRS ser um meio muito rico nutricionalmente. A composição do meio MRS é a seguinte: digestão enzimática de tecido animal, extrato de carne bovina, extrato de levedura, dextrose, acetato de sódio, polisorbato 80, fosfato de potássio, citrato de amônio, sulfato de magnésio e sulfato de manganês, ou seja, sua composição nutritiva confere ambiente favorável em relação aos demais diluentes utilizados (De MAN; ROGOSA; SHARPE, 1960).

Além disso, o tempo de incubação foi outro fator que afetou de forma positiva na análise, tendo em vista que a verificação da amostra após 48h apresentou turbidez mais intensa. Sabe-se que o crescimento celular pode variar de acordo com a variação de fatores como diferentes tipos de diluentes, meio de cultura, temperatura e tempo de incubação. Neste caso, por se tratar de células injuriadas, foi necessário um tempo de incubação maior para aferir a formação de turbidez pelo crescimento celular (EICHNER; DICKSON, 1974; VIEIRA; NAHAS, 2000; MARTINS; FIÚZA; MARTINS, 2013).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados da avaliação dos diferentes diluentes e métodos de plaqueamento na determinação da viabilidade, concluiu-se que o produto probiótico liofilizado apresentou-se num estado de injúria ou perda de sua viabilidade. Considerando isso, não foi possível analisar a variação do tempo de reidratação das amostras visto que não houve crescimento celular suficiente para realizar tal análise.

Por se tratar de um micro-organismo que não suportou o estresse submetido durante o processamento industrial, verificou-se que a utilização de um diluente capaz de conferir maior aporte nutricional e um tempo de incubação mais prolongado propiciaram condições melhores para o crescimento bacteriano.

A amostra analisada não obteve resultados compatíveis com os requisitos estabelecidos por não apresentar quantidades satisfatórias de células viáveis, portanto é possível verificar a importância do amparo por meio da legislação específica responsável por assegurar a qualidade do produto comercializado com laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade, buscando garantir que esse produto confira os efeitos benéficos para a saúde humana, conforme o que foi proposto para sua comercialização.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, Tereza Dávila Freitas et al. Princípios básicos da criomicrobiologia: enfoque nos tipos de micro-organismos e nos principais agentes crioprotetores. **Acta Veterinaria Brasilica**, Rio Grande do Norte, v. 6, n. 2, p. 80-93, 2012. Disponível em: <https://periodicos.ufersa.edu.br/index.php/acta/article/view/2381>. Acesso em: 2 set. 2018.

BAJPAI, V. K. et al. 2018. Prospects of using nanotechnology for food preservation, safety, and security. **Journal of Food and Drug Analysis**, Taiwan, v. 26, n. 4, p.1201-1214, oct. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.06.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949818301169>. Acesso em: 2 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 3029, de 16 de abril de 1999. Versão Consolidada pela Procuradoria da ANVISA. Aprova o Regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 19 abr. 1999a. Seção 1, p. 1. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D3029.htm. Acesso em: 19 out. 2018.

_____. Decreto nº 3571, de 21 de agosto de 2000. Dá nova redação a dispositivos do Regulamento da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aprovado pelo Decreto nº 3029, de 16 de abril de 1999b. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 22 ago. 2000. Seção 1, p. 3. Disponível em: <http://www2.camara.leg.br/legin/fed/decret/2000/decreto-3571-21-agosto-2000-358935-publicacaooriginal-1-pe.html>. Acesso em: 19 out. 2018.

_____. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 6, 9 jan. 2002. Seção 1, p. 191-192. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2002_COMP.pdf/68a25113-35e2-4327-a75f-ae22e714ca7c. Acesso em: 2 set. 2018.

_____. Resolução RDC nº 241, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 144, 27 jul. 2018. Seção 1, p. 97. Disponível em: <http://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=27/07/2018&jornal=515&pagina=97>. Acesso em: 10 out. 2018.

BRENNAN, Merry; WANISMAIL, Bahijah; BIBEK, Ray. Prevalence of viable lactobacillus acidophilus in dried commercial products. **Journal of Food Protection**, [s.l.], v. 46, n.10, p. 887-892, oct. 1983. Disponível em: <http://jfoodprotection.org/doi/pdf/10.4315/0362-028X-46.10.887>. Acesso em: 19 out. 2018.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, [s.l.], v. 28 n. 4, p. 281–370, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1080/1040-840291046759>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12546196>. Acesso em: 19 out. 2018.

CARVALHO, Ana. S. et al. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, [s.l.], v. 14, n. 10, p. 835-847, out. 2004. Disponível em: <https://repositorio.ucp.pt/bitstream/10400.14/3523/3/Relevant%20factors%20for%20the%20preparation%20of%20freeze-dried%20lactic%20acid%20bacteria.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; BROCHU, E.; BEAULIEU, Y. The freeze-drying of lactic acid bacteria: a review. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, [s.l.], v. 24, n. 3/4, p. 118-128, 1991. Disponível em: <https://eurekamag.com/pdf/002/002250734.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

DAILEY, Francis E. et al. Probiotics for gastrointestinal and liver diseases: an updated review of the published literature. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders: Drug Targets**, [s.l.], v. 18, n. 1, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871530318666181022163944>. Disponível em: <http://www.eurekaselect.com/node/166535/article/probiotics-for-gastrointestinal-and-liver-diseases-an-updated-review-of-the-published-literature>. Acesso em: 20 out. 2018.

DALIÉ, D. K. D.; DESCHAMPS, A. M.; RICHARD-FORGET, F. Lactic acid bacteria: potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. **Food Control**, [s.l.], v. 21, n. 4, p. 370-380, abr. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.07.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713509002229>. Acesso em: 12 out. 2018.

De MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. Elisabeth. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 23, n. 1, p.130-135, apr. 1960. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2672.1960.tb00188.x>. Acesso em: 18 out. 2018.

EICHNER, Edward R.; DICKSON, Valerie L. Effect of incubation time on lactobacillus casei bioassay. **American Journal of Clinical Pathology**, [s.l.], v. 62, n. 6, 840-845, dec. 1964. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/62.6.840>. Disponível em: <https://academic.oup.com/ajcp/article-abstract/62/6/840/1765449>. Acesso em: 22 out. 2018.

FAO; WHO – Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. **FAO: Food and Nutrition Paper**, Córdoba, n. 85, 56 p., 1-4 oct. 2001. 2006©. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>. Acesso em: 23 out. 2018.

FEDERAÇÃO DE INDÚSTRIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – FIESP. **A mesa dos brasileiros**: transformações, confirmações e contradições. São Paulo: FIESP; CIESP, 2018. 98 p. Disponível em: <http://hotsite.fiesp.com.br/amesadosbrasil/amesadosbrasil.pdf>. Acesso em: 20 out. 2018.

FLEMMING, J. S.; FREITAS, R. J. S. Avaliação de efeito de prebiótico (MOS), probióticos (*Bacillus licheniformis* e *Bacillus subtilis*) e promotor de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 2, p. 41-47, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v10i2.4412>. Disponível em: <https://revistas.ufpr.br/veterinary/article/view/4412>. Acesso em: 30 out. 2018.

FORSYTHE, Stephen J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607 p. ISBN: 9788536327051.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, [s.l.], v. 66, n. 5, p. 365-378, may 1989. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2666378>. Acesso em: 20 out. 2018.

GBASSI, Gildas. K.; VANDAMME, Thierry. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. **Pharmaceutics**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 149-163, feb. 2012. DOI: <https://dx.doi.org/10.3390%2Fpharmaceutics4010149>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3834910/>. Acesso em: 17 out. 2018.

GONZÁLEZ-DÍAZ, Cristina; GIL-GONZÁLEZ, Diana; ÁLVAREZ-DARDET, Carlos. Scientific evidence on functional food and its commercial communication: a review of legislation in Europe and the USA. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 83, n. 11, p. 2710-2717, 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1750-3841.14359>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1750-3841.14359>. Acesso em: 17 out. 2018.

GUARNER, Francisco et al. World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics, october 2011. **Journal of Clinical Gastroenterology**: [s.l.], v. 46, n. 6, p. 468–481, jul. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e3182549092>. Disponível em: <https://insights.ovid.com/crossref?an=00004836-201207000-00009>. Acesso em: 17 out. 2018.

HADZIEVA, J. et al. Lactobacillus casei encapsulated in soy protein isolate and alginate microparticles prepared by spray drying. **Food Technol. Biotechnol.**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.173–186, apr. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/317971693_Lactobacillus_casei_encapsulated_in_soy_protein_isolate_and_alginate_microparticles_prepared_by_spray_drying. Acesso em: 18 out. 2018.

HER, Jae-Young; KIM, Min Suk; LEE, Kwang-Geun. Preparation of probiotic powder by the spray freeze-drying method. **Journal of Food Engineering**, [s.l.], v. 150, p. 70–74, nov. 2014.

IRAVANI, S.; KORBOKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. **Journal of Food Science and Technology**, [s.l.], v. 52, n. 8, p. 4679-4696, aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1516-2> Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26243890>. Acesso em: 16 out. 2018.

JALALI, M. et al. Stability evaluation of freeze-dried *Lactobacillus paracasei* subsp. tolerance and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in oral capsules. **Research in Pharmaceutical Sciences**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 31-36, jan 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23181077>. Acesso em: 18 out. 2018.

KURTMANN, L. et al. Water activity-temperature state diagrams of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* (La-5): influence of physical state on bacterial survival during storage. **Biotechnol. Prog.**, [s.l.], v. 25, n. 1, jan./feb. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1002/btpr.96>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224603>. Acesso em: 16 out. 2018.

KUSS, Fernando et al. Desempenho e características da carcaça e da carne de novilhos não-castrados alimentados com ou sem adição de monensina e/ou probiótico à dieta. **Ciência Rural**, [s.l.], v. 39, n. 4, p. 1169-1175, mar. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782009005000033>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782009005000033&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em:

LEANDRO, Eliana dos Santos et al. Efeito de protetores e tratamentos de estresse na sobrevivência de *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ao congelamento. **Rev. Inst. Latic**, [s.l.], v. 68, n. 380, p. 37-40, jan./fev. 2013. DOI: <https://doi.org/10.5935/2238-6416.20130006>. Disponível em: <https://www.revistadoilct.com.br/rilct/article/view/6>. Acesso em: 18 out. 2018.

LESLIE, S. B. et al. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 10, p. 3592-3597, oct. 1995. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC167656/>. Acesso em: 17 out. 2018.

LI, Ran et al. Preserving viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in vitro and in vivo by a new encapsulation system. **Journal Control Release**, [s.l.], v. 28; n. 230, p. 79–87, may 2016. DOI: <https://dx.doi.org/10.1016%2Fj.jconrel.2016.04.009>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861679/>. Acesso em: 17 out. 2018.

LILLY, Daniel M.; STILLWELL, Rosalie H. Probiotics: growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, [s.l.], v. 147, n. 3659, p. 747-748, 12

feb. 1965. Disponível em:
<http://science.sciencemag.org/content/147/3659/747.long>. Acesso em: 17 out. 2018.

MACKOWIAK, Philip. A. Recycling Metchnikoff: probiotics, the intestinal microbiome and the quest for long life. **Frontiers Public Health**, [s.l.], v. 1, n. 52, p. 1-3, nov. 2013. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffpubh.2013.00052>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3859987/>. Acesso em: 17 out. 2018.

MARTINS, Suzana Cláudia Silveira; FIÚZA, Larissa Maria Cidrão Guedes; MARTINS, Claudia Miranda. Comparação de diferentes meios de cultivo para a avaliação da viabilidade celular de fermentos biológicos. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n. 16; p. 2478, 2013. Disponível em:
<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2013a/multidisciplinar/COMPARACAO.pdf>. Acesso em: 19 out. 2018.

METCHNIKOFF, Elie; Mitchell, Peter Chalmers. **The prolongation of life: optimistic studies**. New York: The Knickerbocker Press, 1908. 343 p.

MILLS, Susan et al. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. **Microbial Cell Factories**, [s.l.], v. 10, n. 1, 2011. DOI: <https://dx.doi.org/10.1186%2F1475-2859-10-S1-S19>. Disponível em: <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-10-S1-S19>. Acesso em: 22 out. 2018.

MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying: a review. **Journal of Microbiological Methods**, [s.l.], v. 66, n. 2, p.183–193, aug. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.02.017>. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701206000583?via%3Dihub>. Acesso em: 22 out. 2018.

OLIVEIRA, Maricê Nogueira de et al. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Campinas, v. 38, n. 1, 21 p., jan./mar. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322002000100002>. Disponível em:
<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v38n1/v38n1a02.pdf>. Acesso em: 17 out. 2018.

PARKER, R. B. Probiotics: the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, London, v. 29, n. 2, p. 4–8, feb. 1974.

PETRI, R. Uso de exclusão competitiva na avicultura no Brasil. *In*: Simpósio de Sanidade Avícola, 2., 2000, Santa Maria, RS. **Anais [...]**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2000. p. 41-44. Disponível em:
http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais9000_petri.pdf. Acesso em: 22 out. 2018.

QUIGLEY, E.M.M. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. **Pharmacology Research**, [s.l.], v. 61, n. 3, p. 213-218, mar. 2010.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2010.01.004>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20080184>. Acesso em: 15 out. 2018.

RAUTAVA, S.; WALKER, W. Probiotics. *In*: MICHAIL, Sonia; SHERMAN, Philip M. Nutrition and health: probiotics in pediatric medicine. Switzerland: Humana Press, 2009. p. 41-52.

RIBEIRO, Eliana Paula; SIMÕES, Luciana Guedes; JURKIEWICZ, Cynthia Hyppolito. Desenvolvimento de queijo minas frescal adicionado de *Lactobacillus acidophilus* produzido a partir de retentados de ultrafiltração. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 1, p. 19-23, jan./mar. 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n1/v29n1a04.pdf>. Acesso em: 18 out. 2018.

RODRIGUES, Marjory Xavier; FELKL, Gabriela Sartori; BITTENCOURT, Juliana Vitória Messias. Importância das bactérias lácticas para a indústria de alimentos. **Revista UNINGÁ Review**, [s.l.], v. 1, p. 5-12, jan./mar. 2013.

SAAD, Susana Marta Isay. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 1, p. 1-16, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-93322006000100002&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 15 out. 2018.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e próbióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 2008. 119 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SANSONE, F. et al. Development of health products from natural sources. **Current Medicinal Chemistry**, [s.l.], sep. 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867325666180926152139>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30259806>. Acesso em: 14 out. 2018.

SANTIVARANGKNA, C. et al. Role of glassy state on stabilities of freeze-dried probiotics. **Journal of Food Science**, [s.l.], v. 76, n. 8, p.152-156 oct. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02347.x>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22417602>. Acesso em: 15 out. 2018.

SAVINI, M. et al. Pilot-scale production and viability analysis of freeze-dried probiotic bacteria using different protective agents. **Nutrients**, [s.l.], v. 2, n. 3, mar. 2010. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu2030330>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254025>. Acesso em: 15 out. 2018.

SOBRINO-LÓPEZ, A.; MARTÍN-BELLOSO, O. Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy products. **International Dairy Journal**, Spain, v. 18, n. 4, p. 329-343, 2008. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/72b4/54bc7bc85e5080a256a0706df87e8a21ca8c.pdf>. Acesso em: 13 out. 2018.

STRINGHETA, P. C. et al. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, [s.l.], v. 43, n. 2, abr./jun. 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v43n2/03.pdf>. Acesso em: 13 out. 2018.

SULTANA, K. et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-chitosan and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, [s.l.], v. 62, p. 47-55, dec. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11139021>. Acesso em: 15 out. 2018.

VIEIRA, Francisco Cleber Sousa; NAHAS, Ely. Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo. **Scientia Agricola**, São Paulo, v. 57, n. 3, p. 539-545, jul./set. 2000. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-90162000000300026> Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-90162000000300026&script=sci_abstract&tlng=pt. Acesso em: 16 out. 2018.

WESSELS, S. et al. The lactic acid bacteria, the food chain, and their regulation. **Trends in Food Science & Technology**, [s.l.], v. 15, n. 10, p. 498–505, oct. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2004.03.003>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224404000950>. Acesso em: 14 out. 2018.